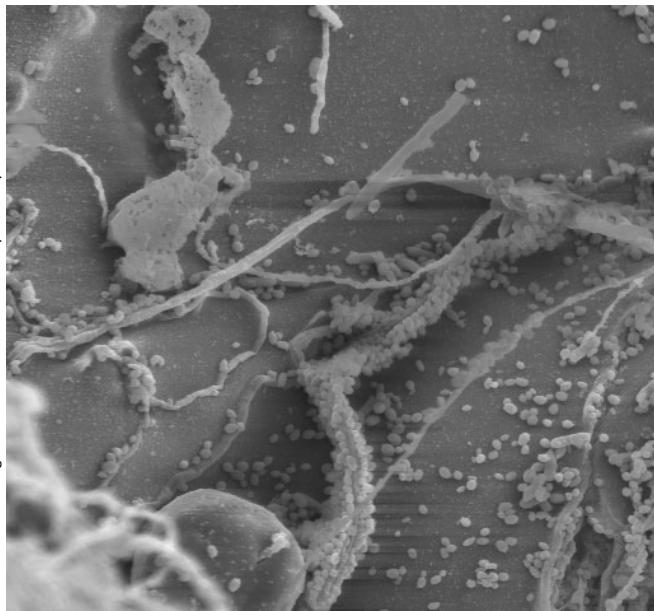


Foto: Eletromicrografia de varredura realizada por Jacqueline Rabelo de Lima



Produção de Sideróforos por Leveduras Antagônicas

Francisco Marto Pinto Viana¹
Jaqueline Rabelo de Lima²
Evelinne M. Bastos de A. C. Feitoza³
Regis Antônio Freitas Medeiros⁴

O controle biológico tem por princípio a utilização de um ser vivo para controlar a população de outro organismo vivo. No caso da fitopatologia, nesse tipo controle, são consideradas diferentes formas de ação, todas estabelecidas com base nas relações ecológicas antagônicas entre os microrganismos: o parasitismo, a predação, a antibiose e a competição, sendo comum a ocorrência de mais de um desses mecanismos por um antagonista eficiente. Apesar de o parasitismo ser considerado uma das mais eficientes estratégias de antagonismo, existem outras que podem, segundo as circunstâncias, ser tão eficientes ou até mais que a primeira, haja vista a complexidade envolvida nos mecanismos, os quais impossibilitam a sobrevivência da outra espécie na área vital de seu antagonico, tal como os sideróforos.

Sideróforo é uma palavra de origem grega que significa "transportador de ferro" e se refere a agente quelante de peso molecular relativamente baixo, elaborado por microrganismos que crescem sob baixa tensão de ferro com o objetivo de capturar íons férricos nesse meio. O ferro é essencial à vida e, apesar de abundante na natureza, não é prontamente disponível e assimilável pelos organismos vivos. Segundo Neilands (1995), a concentração de ferro disponível no meio para a maioria dos microrganismos não é maior que 10^{-18} M, sendo que a maioria deles necessita concentrações de pelo menos 10^{-3} M.

Em 1911, Neilands e Pollock descobriram que toda micobactéria necessitava de uma substância essencial para sobreviver. Tal substância só foi

¹ Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, marto.viana@embrapa.br

² Engenheira de alimentos, D.Sc. em Biotecnologia, professora do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Ceará, Crateús, CE, jaqueline.lima@uece.br

³ Bióloga, técnica da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, evelinne.feitoza@embrapa.br

⁴ Graduando em Agronomia pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, regis.medeiros@ymail.com

isolada e caracterizada quase 40 anos depois (1949-1952), recebendo o nome de “micobactina”. Nesse mesmo período, três outros diferentes sideróforos foram isolados e identificados como fatores de crescimento: a Artrobactina, o Ferricromo e o Coprogênio (BENITE et al., 2002).

A disponibilidade de ferro no substrato é determinante para a maioria dos microrganismos, cuja multiplicação e crescimento podem ser limitados em determinada microbiota; portanto, aquele microrganismo que for capaz de sequestrar o ferro do substrato, tornando esse meio mais pobre na forma disponível desse elemento, terá uma vantagem adicional na competição com outros microrganismos, traduzindo-se tal atividade em importante mecanismo de antagonismo (ROMEIRO, 2007).

Leong (1986), em sua revisão acerca da participação de sideróforos no controle biológico, cita diversos microrganismos fitopatogênicos controlados pela inclusão de microrganismos produtores de sideróforos no meio, como espécies de *Pseudomonas* versus *Erwinia carotovora*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, *Pythium* spp. e outros. Recentemente, Adhikari et al. (2013) verificaram que a produção de sideróforos por *P. seudomonas* fluorescentes pode ser um agente de biocontrole eficaz contra *R. solani* e *S. rolfsii*, tendo verificado que havia redução do antagonismo quando da adição de ferro ao meio. Concluíram esses pesquisadores que diferentes mecanismos podem ser responsáveis pela inibição de *R. solani* e *S. rolfsii* por essas bactérias, mas a produção de sideróforos pode ser o principal deles.

Buscando o controle biológico do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose e da mancha chocolate do mamão, realizaram-se diversos ensaios com leveduras oriundas de frutas tropicais. Este estudo incluiu desde a prospecção, passando por testes de produção de mucocina, testes de antagonismo in vitro, caracterização molecular dos melhores antagonísticos até os testes de antagonismo in vivo, buscando a proteção e a cura de mamões inoculados natural e artificialmente com o patógeno. Posteriormente, verificou-se a necessidade de identificar que formas de antagonismos estavam atuando quando da

efetividade do controle in vivo do fungo pelas leveduras selecionadas. Desse modo, além de outros testes para detecção do tipo de antagonismo envolvido na relação levedura-patógeno, efetuou-se um ensaio para verificar se havia a atuação de sideróforos nessa relação antagônica.

O teste consistiu em avaliar produção de sideróforos por cinco leveduras eleitas como as mais eficientes no controle in vivo da doença incitada por *C. gloeosporioides* no mamão em trabalho anterior (LIMA et al., 2012). Foram investigadas as cepas 419, 420, 422 e 440 de *Wickerhamomyces anomalus* e a cepa 443 de *Meyerozyma guilliermondii*. Para isso, as cepas de leveduras foram repicadas para tubos de ensaio contendo 3 mL de meio de cultura King B (Proteose-peptona #3 – 20 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1,5 g; K_2HPO_4 – 1,5 g; bacto ágar – 15 g; glicerina – 10 mL em 1.000 mL de H_2O destilada) com pH ajustado para 7,2 (MARIANO; SILVEIRA, 2005) e, sob agitação constante, foram incubados por 7 dias a 28 °C. Após esse período, 1 mL de cada cultura de levedura foi centrifugado por 5 minutos a 9.500 G; em seguida, 100 μ L do sobrenadante, resultado da centrifugação de cada cultura, foi adicionado 100 μ L do reagente cromo-azuro S (CAS). A mistura foi incubada por 30 minutos e, após esse período, o meio com as leveduras foi avaliado quanto à viragem de cor. O teste foi replicado, sendo a produção de sideróforos pelos isolados indicada pela coloração alaranjada ou amarelada no meio (coloração vermelho-claro na Figura 1). O meio de cultura KB sem inóculo foi utilizado como controle negativo.

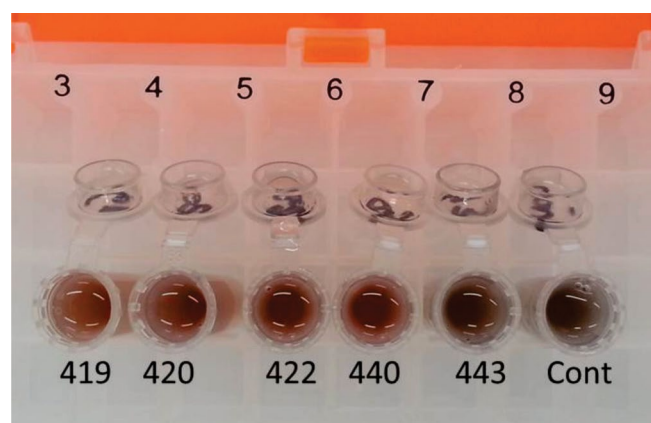


Figura 1. Resultado do teste de produção de sideróforos por diferentes cepas de leveduras demonstrado pela viragem da coloração pelo cromo-azuro.

Dentre as cepas avaliadas, apenas uma não foi capaz de produzir sideróforos nas condições deste ensaio, a cepa 443 de *Meyerozyma guilliermondii*. Tan et al. (2013) verificaram que duas estirpes de *Bacillus amyloliquefaciens*, 'CM-2' e 'T-5', em comparação com o controle, foram capazes de reduzir a incidência da doença incitada por *Ralstonia solanaceum* em mudas de tomate em 70,1% e 79,4%, respectivamente, contabilizando sideróforos entre os fatores de controle.

Contudo, este resultado foi importante para a investigação do tipo de antagonismo envolvido entre as leveduras antagonistas estudadas e o patógeno, o que poderá refletir em estratégias futuras de controle a serem empregadas.

Verificou-se, em estudos in vitro anteriores (LIMA et al., 2012), que *Meyerozyma guilliermondii* – cepa 443 produz toxina *killer* (mucocina) e glucanase, como as outras quatro leveduras estudadas, e foi a levedura mais eficiente no antagonismo contra o agente da antracnose do mamão, o que pode sugerir que essa levedura produz algum outro metabólito, ainda não detectado, que potencializa o seu antagonismo verificado também in vivo em relação ao *Colletotrichum gloeosporioides* no mamão (LIMA et al., 2013). Estudos posteriores poderão esclarecer essa hipótese.

Referências

- ADHIKARI, A.; SARKER, K.; DE ROY, M.; BHATTACHARYA, I.; MANDAL, T.; DASMOHAPATRA, P. K.; DUTTA, S. Siderophore mediated antagonism of fluorescent *Pseudomonads* against soil borne plant pathogenic fungi in West Bengal, India. *African Journal of Microbiology Research*, v. 7, n. 39, p. 4689-4700, 2013.
- BENITE, A. N. C.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos: “uma resposta dos microorganismos”. *Química Nova*, v. 25, n. 6B, p. 1155-1164, 2002.
- LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, v. 24, p.187-209, 1986.
- LIMA, J. R.; GONDIM, D. M. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; OLIVEIRA, F. S. A.; GONÇALVES, L. R. B.; VIANA, F. M. P. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology*, v. 83, p. 58-64, 2013.
- LIMA, J. R.; GONÇALVES, L. R. B.; BRANDÃO, L. R.; ROSA, C. A.; VIANA, F. M. P. Isolation, identification and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated of tropical fruits. *Journal of Basic Microbiology*, v. 52, p.1-10, 2012.
- MARIANO, R. de L. R.; SILVEIRA, E. B. da S. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2. ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005.
- NEILANDS, J. B. Siderophores: structure and functions of microbial iron transport compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 26723-26726, 1995.
- TAN, S.; JIANG, Y.; SONG S.; HUANG, J.; LING, N.; XU, Y.; SHEN, Q. Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanaceum* and promoting tomato plant growth. *Crop Protection*, v. 43, p.134-140, 2013.
- ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 269 p.

Comunicado Técnico, 211



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria Tropical
Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici,
 CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Fone: (0xx85) 3391-7100
Fax: (0xx85) 3391-7109 / 3391-7141
E-mail: cnpat.sac@embrapa.br

1ª edição (2013): versão eletrônica

Comitê de Publicações

Presidente: Marlon Vagner Valentim Martins
Secretário-Executivo: Marcos Antônio Nakayama
Membros: José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cassia Costa Cid, Rubens Sonsol Gondim, Fábio Rodrigues de Miranda.

Expediente

Revisão de texto: Marcos Antônio Nakayama
Editoração eletrônica: Arilo Nobre de Oliveira
Normalização bibliográfica: Rita de Cassia Costa Cid